云南植物研究 1988; 10 (3): 297—303
Acta Botanica Yunnanica

检测烟草中烟草花叶病毒的RNA斑点杂交法

王 钧

(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

摘要 用普通烟草花叶病毒OM株3′-端约2kb的cDNA为探针，探索了用RNA斑点杂交法对烟草组织中烟草花叶病毒RNA进行检测的条件。这些条件包括用分子杂交法观察云南烟区和上海烟草上分到的烟草花叶病毒与OM株的同源性，从烟草组织中提取烟草花叶病毒的几种方法的比较，使RNA有效地固定在硝酸纤维素滤膜上的方法，烟草组织中是否有干扰RNA固定和杂交的物质，斑点杂交方法检测烟草花叶病毒的特异性、灵敏度等。

关键词 RNA斑点杂交；烟草；烟草花叶病毒

用植物RNA病毒的cDNA为探针，通过固相分子杂交可以检测植物提取液中该病毒或它的片段的存在和数量。由于cDNA只和同源互补的核酸杂交，植物提取液中其它核酸往往不会干扰。这样，植物提取液有可能不必经过RNA分离、Northern转移，而直接滴加在硝酸纤维素薄膜上，通过斑点杂交进行鉴定甚至半定量测定[1, 2]。最近，对烟草中烟草花叶病毒（TMV）[3]、马铃薯中马铃薯x病毒（PVX）[4]已发展出这种检测方法。为了了解烟草中烟草花叶病毒的动态和它的cDNA在导入烟草基因组后表达出的RNA动态变化，我们也建立了相应的RNA斑点杂交方法。本文报道我们关于检测条件所做研究的一些结果。

材 料 和 方 法

1.病毒和cDNA探针

烟草花叶病毒OM株得自Tetsuo Meshi[5]，上海分离株得自孙玉昆，玉溪分离株是我们从云南玉溪烟田分离；黄瓜花叶病毒得自袁贤溶。烟草花叶病毒cDNA探针来自Tetsuo Meshi，为pOM5H2，它含有烟草花叶病毒OM株3′-端约2kb区段的cDNA。

2.烟叶中病毒RNA粗提液的制备

我们曾使用三种提取方法：

（1）磷酸缓冲液抽提、酚处理方法——鲜叶或-20℃低温冰箱保存的烟叶，每克加2 ml提取缓冲液（0.1mol/l磷酸钠、pH8.0，5 mmol/l EDTA，0.1%β-巯基乙醇，0.01%焦碳酸二乙酯）。匀浆后，用日立高速离心机RPR20-3转子14000rpm离心10分钟或用高速台式离心机16000 rpm离心5分钟，取上清液，加1/2体积提取缓冲液饱和

1987-07-16收稿

的酚，振摇5分钟，再加1/2体积氯仿-异戊醇（24:1）振摇5分钟。离心，取上层水相，加1/10体积3 mol/l醋酸钠（pH5.4），二体积无水乙醇，混匀，-20℃放20分钟。离心，沉淀用70％乙醇洗两次，减压抽干。

（2）十六烷基溴化铵（CTAB）抽提和沉淀法[6]——鲜叶或-20℃低温冰箱保存叶，每克加2 ml两倍浓度的CTAB提取缓冲液（2％CTAB，100 mmol Tris-Cl，pH8.0 20mmol/l EDTA，1.4 mol/l NaCl），匀浆，55℃保温10分钟。依上法离心，上清液加等体积CTAB沉淀缓冲液（1％CTAB，50 mmol/l Tris-Cl，pH8.0，0.1 mmol/l EDTA），室温放置半小时。离心取沉淀，用70％乙醇洗沉淀两次，减压抽干。

（3）硫氰酸胍抽提和酚处理法[7]——鲜叶或-20℃低温保存叶，每克加2 ml硫氰酸胍提取缓冲液（4 mol/l硫氰酸胍，0.5％月桂酰肌氨酸钠，25 mmol/l柠檬酸钠，0.1 mol/l β-巯基乙醇），匀浆，同上法离心。上清液用1/2体积Tris-Cl(pH7.5)饱和酚提取5分钟，再用一体积氯仿-异戊醇提取5分钟。离心取上清液，加1/10体积3 mol/l醋酸钠（pH5.4）和三体积无水乙醇，置-20℃冰箱半小时。离心取沉淀，用大量70％乙醇洗沉淀三次，减压抽干。

3.放射性标记cDNA探针制备

用pOM5H2质粒本身或它的含烟草花叶病毒cDNA的Pst I片段，以^{32}P-dCTP（～3000Ci/mmol 1^{-1}）按BRL缺口翻译试剂盒所示方法进行标记；用细粒型Sephadex G-75柱以10 mmol/l Tris-Cl（pH8.0），50 mmol/l NaCl，0.1 mmol/l EDTA（pH 8.0）洗脱与残余放射性dCTP分离，取放射性最强的组份作为放射性标记的cDNA探针用于分子杂交。通常标记放射活性约为1—2×10^6cpm/μg，Pst I片段是由pOM5H2经Pst I酶切，3.5％聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，溴化乙锭染色，切取含cDNA的2 kb片段凝胶带，置透析袋电洗脱，正丁醇抽除溴化乙锭，加醋酸钠（3 mol/l，pH5.4）和二体积无水乙醇沉淀，70％乙醇清洗，抽干而获取。

4.病毒RNA和烟叶病毒RNA粗提液的变性

适量病毒RNA（通常约1μg）或烟叶病毒RNA粗提物，溶于500μl的20×SSPE（1×SSPE＝0.18 mol/l NaCl，10 mmol/l磷酸钠，1 mmol/l EDTA），离心，取400μl上清液。加200μl 20×SSPE，200μl 37％甲醛，混合，65℃下放置45分钟，取出置冰水浴备用。也可混合后室温放置约两小时后使用。

5.RNA斑点杂交

Bio-Rad的Bio-Dotth微滤板，用0.1％过氧乙酸浸泡数小时，用无RNA酶的无菌水清洗去酸，夹入2.5×SSPE浸处过的硝酸纤维素滤膜，各微滤孔再用400μl的20×SSPE清洗一次。向各滤孔加入变性处理过的病毒RNA或烟叶病毒RNA粗提液，抽干。用400μl 20×SSPE清洗一次，抽干后取出滤膜，置双层滤纸间，80℃真空抽气两小时，使RNA充分固着在滤膜上。把此滤膜放入比膜稍大的塑料袋中，加入少量预杂交液（每102.5 ml预杂交液含50 ml已用混合型离子交换树脂处理过的甲酰胺，2.5ml 2 mol/l磷酸钠缓冲液，10ml 100×Denhardt试剂，15ml 20×SSPE，25ml变性过的浓度为2 mg/ml的鲑鱼DNA。磷酸钠缓冲液是等当量Na_2HPO_4和NaH_2PO_4的混合物。100×Denhardt试剂为2％聚乙烯吡咯烷酮，2％ Ficoll 400和2％小牛血清白蛋白。变性鲑

鱼DNA为50 mg鲑鱼DNA，溶于25 ml水中，100℃下煮沸10分钟，立即放在冰浴中，分装成小包装，贮于-80℃冰箱中备用），混匀，去气泡，封好塑料袋口，置42℃水浴过夜。剪开袋上一角，挤去大部分预杂交液，加入标记探针（一般每100 cm^2 口袋内加150 μl左右），混匀，去泡，封口，于42℃水浴放置10小时左右。将硝酸纤维素膜取出，先用少量0.1×SSPE，0.1% SDS液清洗一次，再用多量上述清洗液在50℃条件下反复清洗三次，每次半小时。将滤膜置滤纸上气干，包入保鲜塑料薄膜中，和x光底片一起夹在带增感片的夹子中，置-80℃冰箱一或数天，用x光片冲洗液显影和定影。

6.药　品

十六烷基溴化铵、聚乙烯吡咯烷酮、吗啡啉丙基磺酸来自Sigma。焦碳酸二乙酯来自Aldrich。Ficoll 400、Sephadex G-75来自Pharmacia。甲酰胺来自BASF。混合型离子交换树脂AG501-X8来自Bio-Rad。限制性内切酶Pst I、RNA酶A、DNA酶I来自Boehringer。^{32}P-dCTP（3000 Ci/mmol 1^{-1}）来自Amersham。月桂酰肌氨酸钠来自Serva。硝酸纤维素滤膜来自Schlercher & Schuell。其它试剂均为国产AR级试剂。

涉及RNA处理的操作中，全部使用的器皿、水和大部分试液，都经高压灭菌处理。操作时戴手套，严防外源RNA酶对样品的污染。

结果和讨论

1.玉溪和上海分离的烟草花叶病毒RNA 3′-端和OM株同源

从烟草上分得的烟草花叶病毒有Vulgare株和U_2株。二者RNA同源性很差，血清反应也不相同[8，9]。OM株与Vulgare株同源。我们已用酶标免疫测定法证明烟草花叶病毒上海分离株和OM株、玉溪分离株同源。这里，我们证明在相同的RNA浓度下，OM株3′-端cDNA和OM株、上海株、玉溪株RNA斑点杂交强度相似（图1）。这也表明三者RNA 3′-端有很高的同源性；用OM株RNA3′-端的cDNA可以检测玉溪和上海田间烟草花叶病毒动态。

2.磷酸缓冲液抽提、酚处理法适于烟叶中病毒RNA的制备

硫氰酸胍能在一分钟内破坏组织中RNA酶[7]，十六烷基溴化铵也极易使植物体内蛋白失活。它们均为分离植物RNA时优先选用的试剂[6]。磷酸缓冲液和酚处理法是从植物中分离烟草花叶病毒常用的方法。这里在提取烟叶中烟草花叶病毒时，我们将用硫氰酸胍和十六烷基溴化铵提取植物RNA的方法和常用的磷酸缓冲液法进行了比较。结果见图2。

从图2的1—3可见三种方法结果相似。但十六烷基溴化铵法、硫氰酸胍法结果往往不稳定（结果未列出）。硫氰酸胍提取液和酚互溶性好，在酚处理时只有加大量氯仿才能避免RNA丢失；同时未去尽硫氰酸胍的样品加到滤板孔后，也很难通过硝酸纤维滤膜。所以我们仍选用磷酸缓冲液和酚处理法抽提烟叶中烟草花叶病毒RNA。

但是用磷酸缓冲液和酚处理后的样品中，还残有少量RNA酶活性。从图2的3—5可见提取液在室温放置时间过长或有外源RNA酶导入样品，测得的病毒RNA量都会减少。所以，整个操作应在较低的温度和完全避免外源RNA酶干扰的条件下进行。样品应

新鲜制备和立即使用；如果样品不能及时使用，应贮于低温冰箱中。

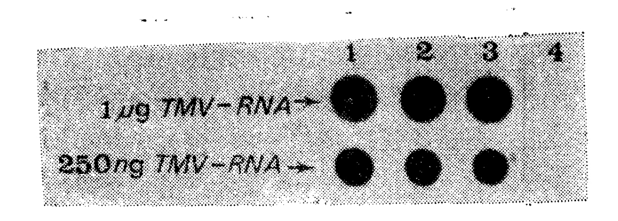


图 1 烟草花叶病毒（TMV）OM 株 cDNA探针和玉溪、上海分离的烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒（CMV）的RNA斑点杂交（自显影18小时）

1. TMV OM株； 2. 玉溪分离TMV株； 3. 上海分离TMV株； 4.上海分离CMV株。

Fig. 1 RNA dot hybridization between the cDNA of TMV strain OM and TMV strains isolated from Yuxi and Shanghai, CMV strain isolated from Shanghai (autoradiogram:18 hours)

1. TMV strain OM; 2. TMV isolated from Yuxi; 3. TMV isolated from Shanghai; 4. CMV isolated from Shanghai.

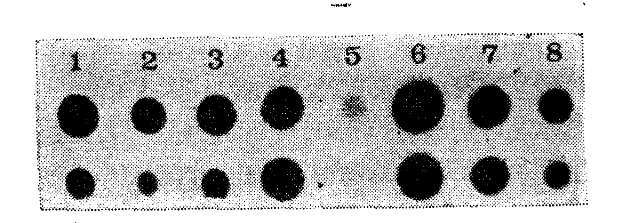


图 2 从烟草叶子分离TMV-RNA的方法的比较

（A）不同方法的比较（上行：200ng病毒RNA；下行：25ng病毒RNA）

1.用硫氰酸胍缓冲液；2.用十六烷基溴化铵缓冲液；3.用磷酸盐缓冲液。

（B）内源外源RNA酶对用磷酸盐缓冲液法分离的 TMV-RNA 检测的影响（上行：病叶 80mg；下行：病叶20mg）

4.样品在室温放置24小时；5.样品加RNA酶处理，室温，1小时；6.样品分离后立即使用。

（C）十二烷基硫酸钠（SDS）对磷酸盐缓冲液提取效率的影响（上行：病叶80mg；下行：病叶20mg）

7.用含0.1% SDS的磷酸盐提取得到的TMV-RNA（水相）；8.从样品 7 的酚相回收的TMV-RNA。

Fig. 2 Comparison of the methods for isolation of TMV-RNA from tobacco leave

(A) Comparison of different methods (viral RNA:upper line, 200ng; lower line, 25ng), 1. use guanidinium thiocyanate buffer; 2. use cetyl trimethylamonium bromide buffer; 3. use phosphate buffer.

(B) The influence of internal and external RNAse on the detection of TMV-RNA isolated by phosphate buffer (infected leave:upper line, 80mg, lower line, 20mg): 4. put sample on room temperature about 24 hours; 5. treat sample with RNAse; 6. use isolated RNA sample immediately.

(C) The influence of SDS on the extract efficiency of phosphate buffer (infected leave:upper line, 80mg; lower line, 20 mg): 7. isolate TMV-RNA sample by the phosphate buffer containing 0.1% SDS (water phase); 8. rescue residual TMV-RNA from phenol phase of sample 7.

我们也曾象Sela那样在提取缓冲液中加0.1%的SDS。从图2的6—7可见磷酸缓冲液中加SDS反而降低了提取效率。

3.样品变性、酚处理和高盐浓度的必要性

为了使样品中RNA能充份吸留在硝酸纤维素滤膜上，一般都主张把样品溶解在高浓度的SSPE或SSC中。4×或6×SSPE不足以使RNA充分束缚在硝酸纤维素滤膜上[10]。为了使RNA有效地吸留在硝酸纤维素滤膜上，样品往往还要预先变性，甲醛是比乙二醛更好的RNA变性剂[2]。最近Baulcombe等人[4]认为未经变性的马铃薯x病毒也能很好地吸留在经过20×SSPE处理和干燥过的硝酸纤维素滤膜上。

我们试验的结果见图3。在硝酸纤维素滤膜先用低浓度SSPE清洗和样品溶于2.5×SSPE的条件下，病毒RNA很难固着在硝酸纤维素滤膜上；如样品经过酚或变性处理，病毒RNA就能部分地吸留在滤膜上；如果样品经双重处理，吸留量更大。在硝酸纤维素滤膜用高浓度盐溶液预清洗和样品溶于20×SSPE的条件下，未经酚和变性处理的样品RNA在滤膜上的吸留量也很低；样品经变性或酚处理后，病毒RNA在滤膜上的吸留量明显增加；样品经双重处理又溶在10×SSPE中，样品中病毒RNA在滤膜上的吸留量最高。因此，在我们常规操作中，样品都经酚处理，溶于高浓度SSPE，以终浓度为9%的甲醛变性后（样品中最终盐浓度为15×SSPE），加在预先夹在微滤板中经20×SSPE清洗的硝酸纤维素滤膜上。

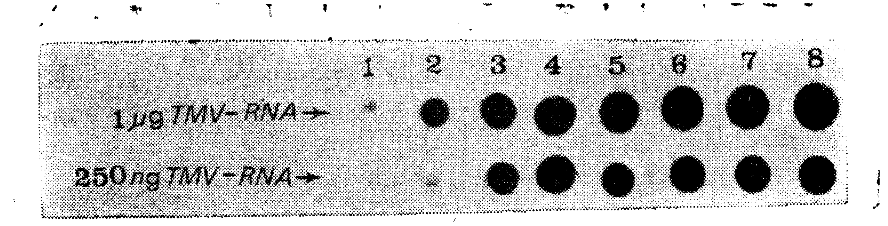


图3　样品浓度、用酚、甲醛处理对硝酸纤维素滤膜吸附TMV-RNA的影响（自显影18小时）

1.样品溶于2.5×SSPE；2.样品溶于2.5×SSPE，用甲醛处理；3.样品溶于10×SSPE；4.样品溶于10×SSPE，用甲醛处理；5.样品溶于2.5×SSPE，用酚处理；6.样品溶于2.5×SSPE，用酚、甲醛处理；7.样品溶于10×SSPE，用酚处理；8.样品溶于10×SSPE，用酚、甲醛处理。

Fig. 3　The influence of concentration of salt in sample and treatment of sample with phenol and formaldehyde on the adsorption of TMV-RNA onto nitrocellulose filter (autoradiogram; 18 hours)

1. sample in 2.5×SSPE; 2. sample in 2.5×SSPE, treatment with formaldehyde; 3.sample in 10×SSPE; 4.sample in 10×SSPE, treatment with formaldehyde; 5.sample in 2.5×SSPE, treatment with phenol; 6. sample in 2.5×SSPE, treatment with phenol and formaldehyde; 7. sample in 10×SSPE, treatment with phenol; 8. sample in 10×SSPE, treatment with phenol and formaldehyde.

4.烟叶提取物中不存在严重干扰检测烟草花叶病毒RNA的物质

健康烟叶经三种提取缓冲液提取处理后，用pOM5H2探针杂交，仅在较长时间自显影后才出现微弱背景（见图4的1—3）。由于20mg病叶中烟草花叶病毒RNA量经常

接近1μg水平，而20mg健康烟叶提取物引起的背景往往低于25pg，对于检测烟叶中烟草花叶病毒动态，一般不会有多少干扰。

从图4的4—5还可看出健康烟叶病毒后，经磷酸缓冲液抽提、酚处理后，斑点杂交点的强度和等量纯病毒经相同方法处理后所得强度相同或稍高。这表明烟叶中不存在干扰病毒抽提、病毒RNA在滤膜上吸留和进行分子杂交的物质。

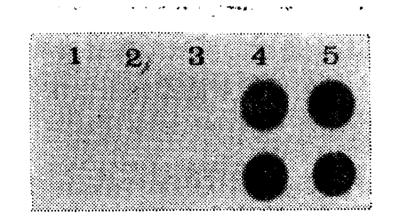


图4 烟草叶中可溶性物质对TMV-RNA斑点杂交的影响（上行：健叶80mg或病毒20μg，下行：健叶20mg或病毒5μg）
1.健康烟叶用硫氰酸胍缓冲液提取；2.健康烟叶用十六烷基溴化铵缓冲液提取；3.健康烟叶用磷酸盐缓冲液提取；4.病毒粒子用磷酸盐缓冲液提取；5.病毒粒子和健康烟叶混合后用磷酸缓冲液提取。

Fig. 4 The influence of tobacco leave soluble substance on dot hybridization of TMV-RNA (upper line: healthy leave 80mg or virus 20ug, lower line: healthy leave 20mg or virus 5 ug)
1. healthy leave extracted by guanidium thiocyanate buffer; 2. healthy leave extracted by cetyl trimethylamonium bromide buffer; 3. healthy leave extracted by phosphate buffer; 4. virus particle extracted by phosphate buffer; 5. virus particle + healthy leave extracted by phosphate buffer.

5.用烟草花叶病毒RNA 3′-端cDNA检测烟叶中烟草花叶病毒的特异性和灵敏度

云南烟区烟草病毒病病原主要是烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒；二者引起的花叶病症状不易区别。我们证明在3μg RNA剂量条件下，黄瓜花叶病毒RNA仍不和pOM5H2探针反应（图1），表明这种探针在检测烟草中烟草花叶病毒方面具有特异性。

检测反应本身的灵敏度和探针放射性比活力的强度相关，Sela等人[3]用～10^8 cpm/μg的烟草花叶病毒总cDNA为探针，用斑点杂交法检测到的烟草花叶病毒RNA的低限为2.5pg。我们用分子量相似的pOM5H2(分子量为6.3kb)为探针，一般标记强度在1—10×10^6cpm/μg范围内，放射自显影三天，能检测的烟草花叶病毒RNA低限约为25pg，与20mg健叶引起的背景相似。

我们曾初步探索用斑点杂交法定量测定烟草中烟草花叶病毒的可能性。结果表明，即使用纯病毒RNA，微滤板中每孔加入的病毒RNA量需在50—5ng以下、25pg以上、（随探针放射性比活和自显影时间不同而有一定变幅）才有进行半定量测定的可能性。

致谢 本工作在经费上得到云南省科委支助，在条件上得到上海植物生理研究所帮助；陈文岗、胡运乾参加了本工作的预备性工作，包括病毒制备和一些初步试验。

参 考 文 献

1 Thomas P S. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77:5201—5205
2 White B A, Bancroft F C. *J Biol Chem* 1982; 257:8569—8572
3 Sela J et al. *Phytopathol* 1984; 74:385—389
4 Baulcombe D et al. *Pl Pathol* 1984; 33:361—370
5 Meshi T et al. *Virology* 1982; 118:64—75
6 Taylor B, Powell A. *Focus* 1982; 4(3): 4—6
7 Chirgwin J M et al. *Biochem* 1979; 18:5294—5299
8 Van Regenmort M H V. in Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Kurstak E Ed. Amsterdam; North-Holland Publ. 1980; 341—564
9 Palukaitis P. Symons R H. *Virology* 1980; 107:354—360
10 Nagamine Y et al. *Nucl Acids Res* 1980; 8:2453—2460

RNA DOT HYBRIDIZATION FOR DETECTING TOBACCO MOSAIC VIRUS IN TOBACCO LEAVE

Wang Jun

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Abstract The conditions for detecting tobacco mosaic virus (TMV) RNA in tobacco leave extract by RNA dot hybridization using a radioactive probe containing the cDNA of 3′ terminal RNA of TMV strain OM have been studied. These conditions include the homology between the TMV strains isolated from Yunnan and Shanghai and the strain OM, the method for extracting viral RNA from tobacco leave and for adsorbing the extracted viral RNA onto nitrocellulose filter efficiently, the material interrupting the adsorption of viral RNA onto nitrocellulose filter and the hybridization of viral RNA with probe, and the speciality, sensitivity of the RNA dot hybridization method for detecting TMV-RNA in tobacco leave.

Key words RNA dot hybridization; Tobacco; TMV-RNA